

Научная сессия Белорусский государственный медицинский университет, секция
«Эпидемиология и микробиология»

Доклад по теме:

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ПЦР В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО» ВРЕМЕНИ ДЛЯ
ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИИ N501Y В ГЕНОМЕ ВИРУСА SARS-COV-2**

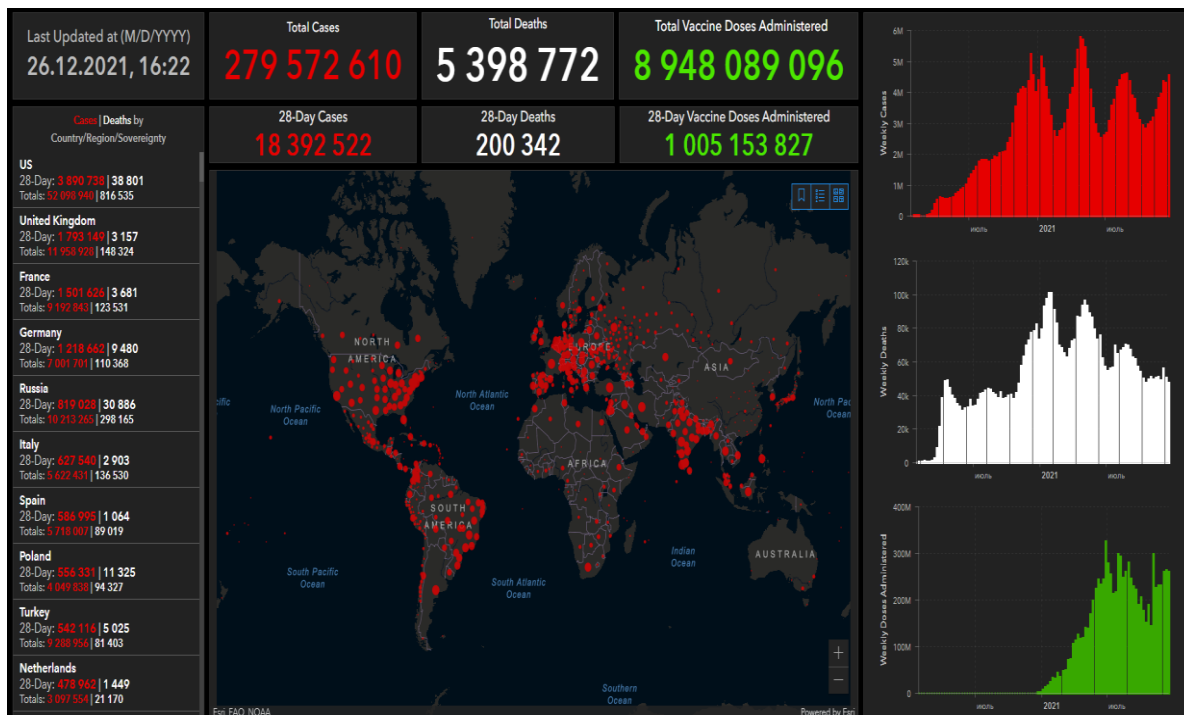
Д.б.н., Гасич Е.Л., Булда К.Ю., Дрозд А.М.

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии

Минск 25 января 2022



АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ



Информация об основных показателях эпидемии COVID-19 в мире

График заражения COVID-19 в Беларуси по дням

На графике вы можете наблюдать ситуацию за весь период эпидемии коронавируса в Беларуси.

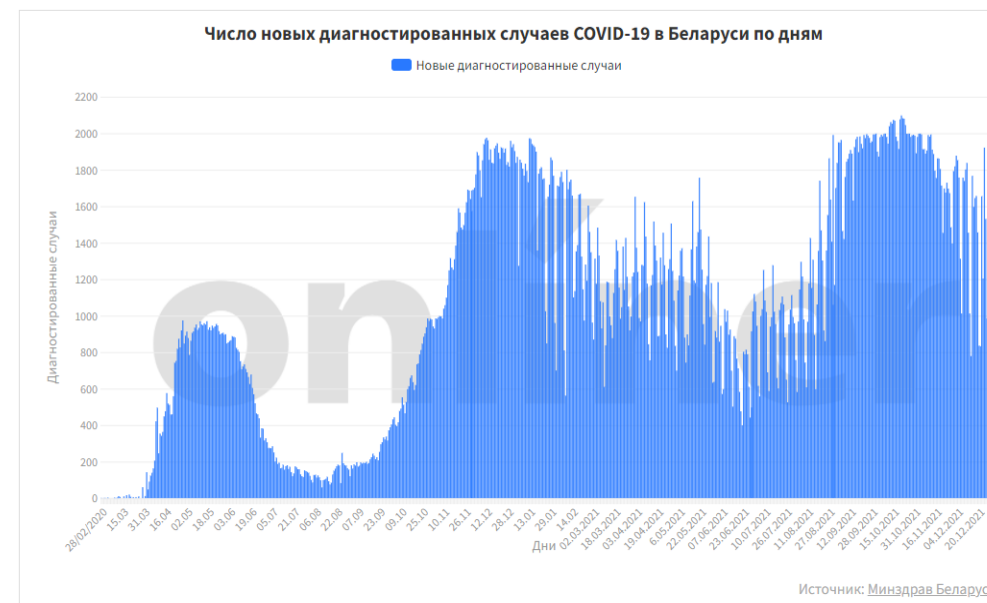
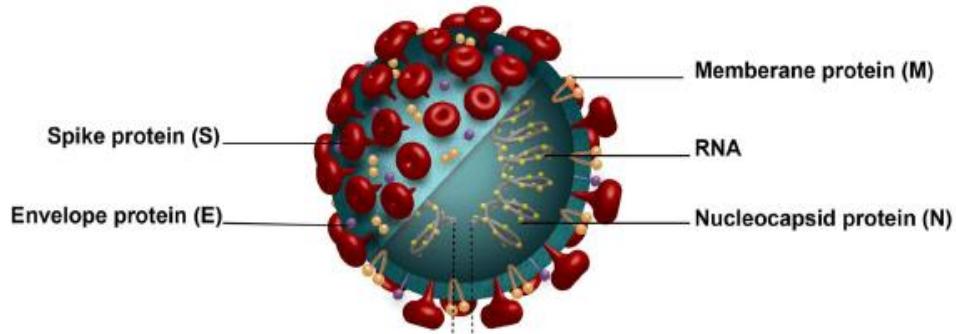
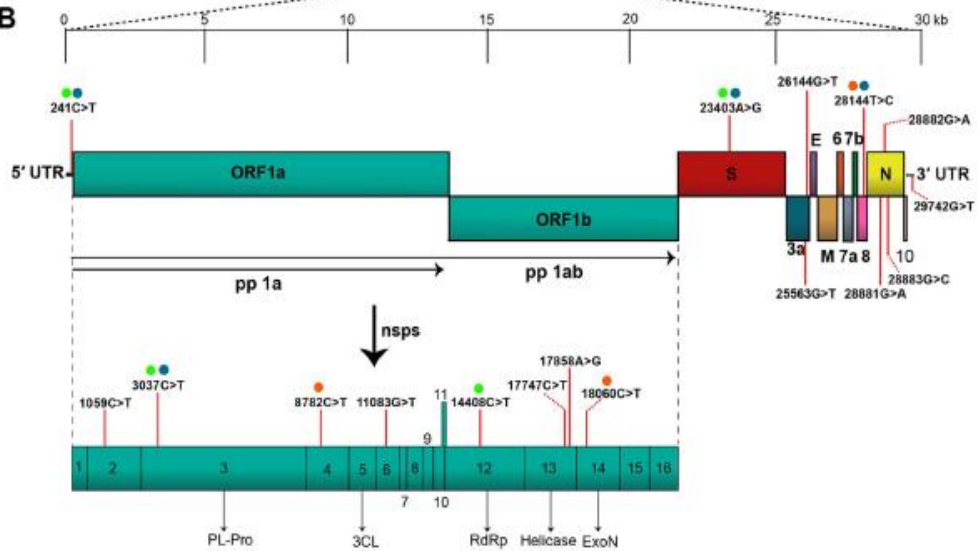
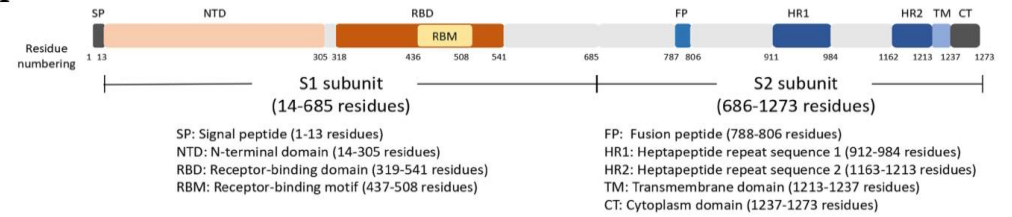
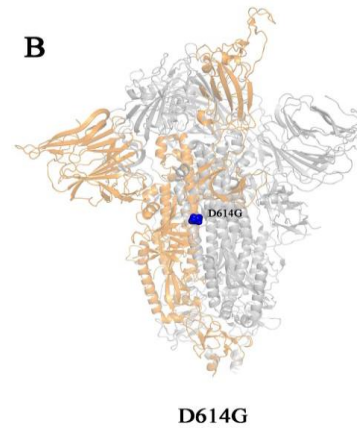
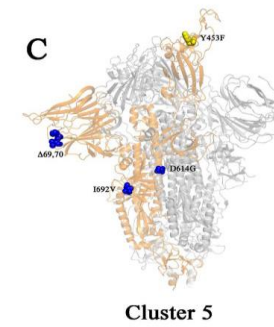


График диагностированных случаев COVID-19 в Республике Беларусь

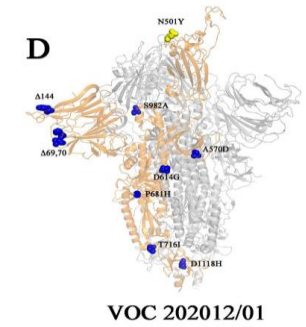


A**B**

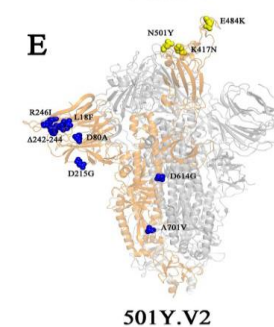
Структурная организация генома
вируса SARS-CoV-2

A**B****C**

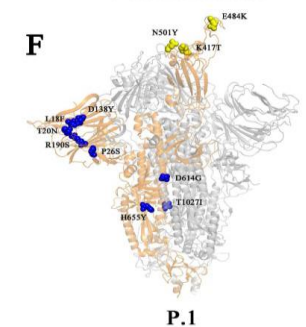
Cluster 5

D

VOC 202012/01

E

501Y.V2

F

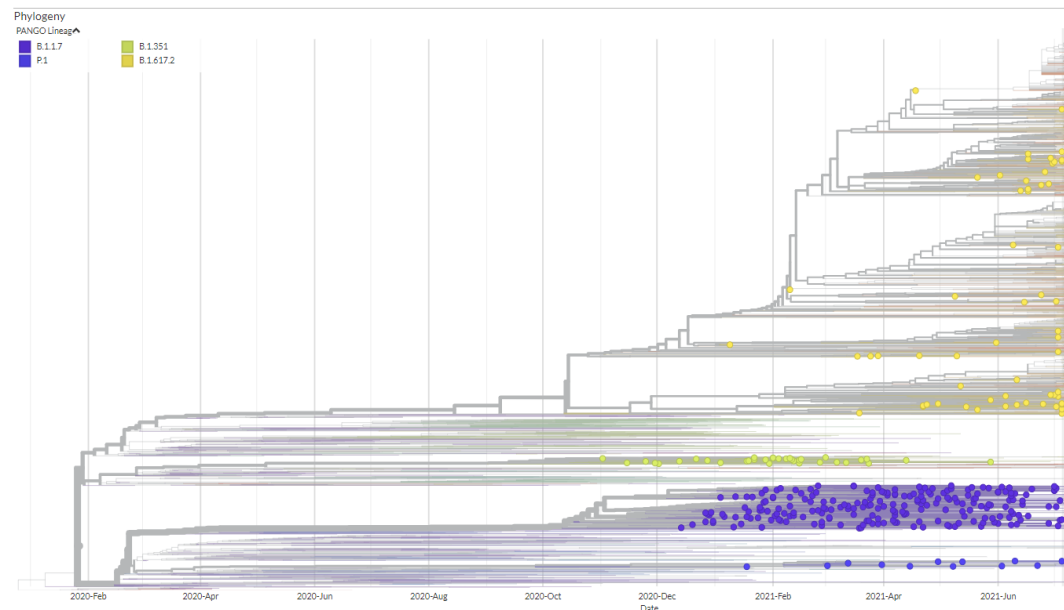
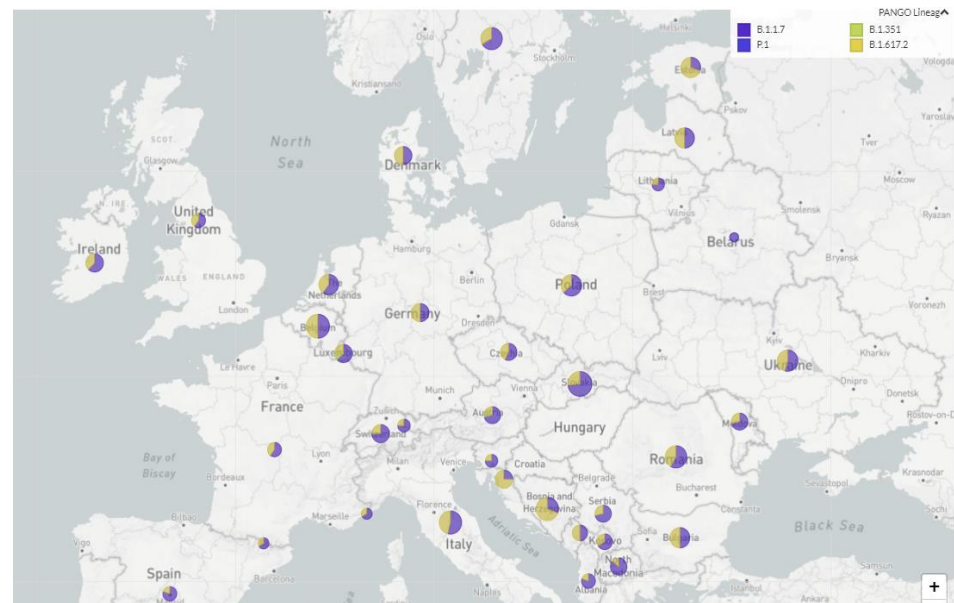
P.1

Структура S белка и его мутации в
генетических вариантах, вызывающих
озабоченность

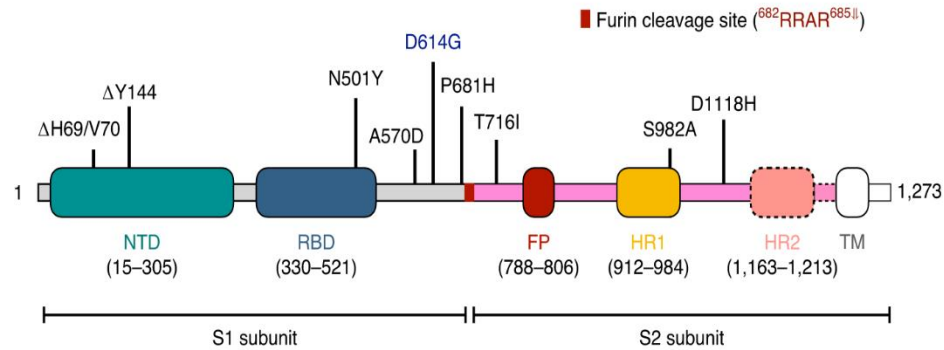


ВАРИАНТЫ ВИРУСА SARS-COV-2, КЛАССИФИЦИРОВАННЫЕ КАК ВЫЗЫВАЮЩИЕ ОЗАБОЧЕННОСТЬ

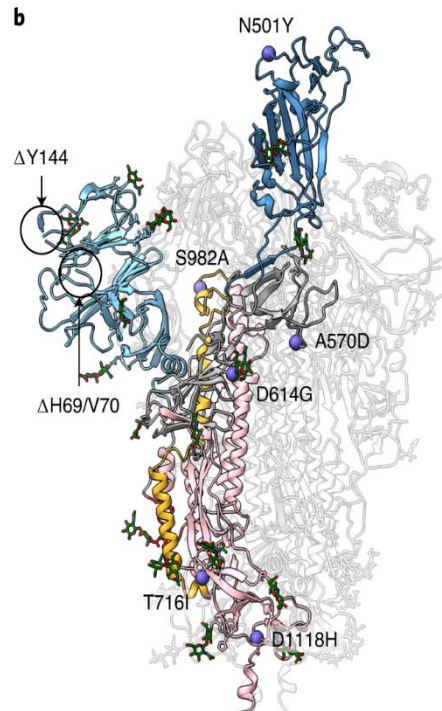
Маркировка ВОЗ	Классификация Pango	Классификация GISAID	Классификация Nextstrain	Дополнительные аминокислотные замены, являющиеся объектом мониторинга	Первые выявленные образцы	Дата классификации
Альфа	B.1.1.7	GRY	20I (V1)	+S:484K; +S:452R	Соединенное Королевство, сентябрь 2020г.	18 декабря 2020 г.
Бета	B.1.351	GH/501Y.V2	20H (V2)	+S:L18F	Южная Африка, май 2020 г.	18 декабря 2020 г.
Гамма	P.1	GR/501Y.V3	20J (V3)	+S:681H	Бразилия, ноябрь 2020 г.	11 января 2021 г.
Дельта	B.1.617.2	G/478K.V1	21A	+S:417N	Индия, октябрь 2020 г.	11 мая 2021 г.
Омикрон	B.1.1.529	GRA	21K, 21L 21M	+S:R346K	Несколько стран, ноябрь 2021	26 ноября 2021 г.



ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ВАРИАНТА В.1.1.7



- Доменная структура S белка варианта В.1.1.7 вируса SARS-CoV-2 с указанными мутациями ΔH69/V70, ΔY144, N501Y, A570D, D614G, P681H



- Белковая структура S белка варианта В.1.1.7 вируса SARS-CoV-2 с указанными на ней мутациями



ИНСТРУМЕНТЫ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ SARS-CoV-2



NGS секвенирование



Секвенирование по Сэнгеру



ПЦР в режиме «реального» времени

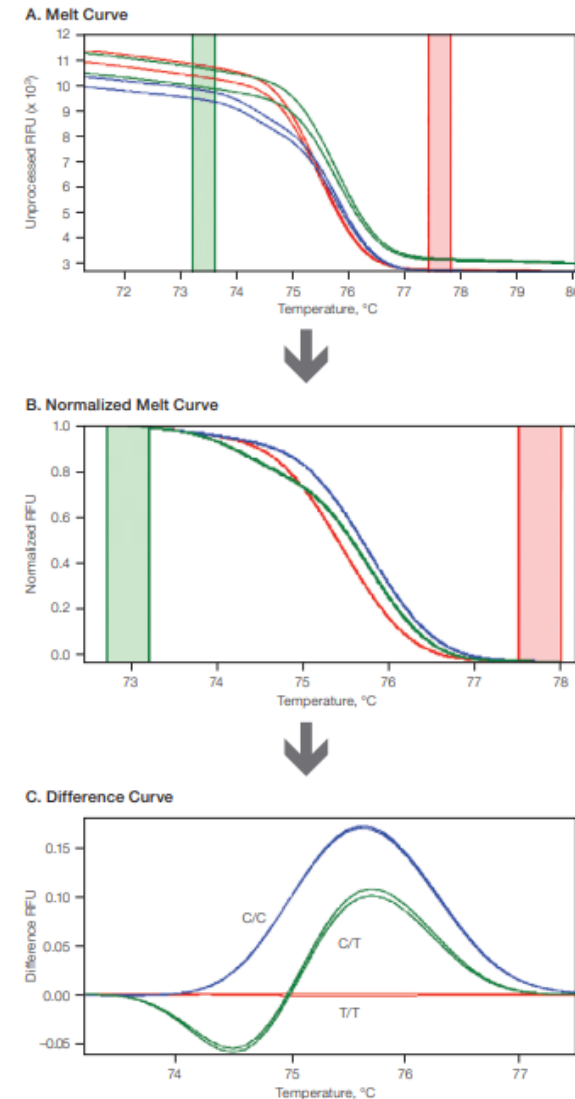


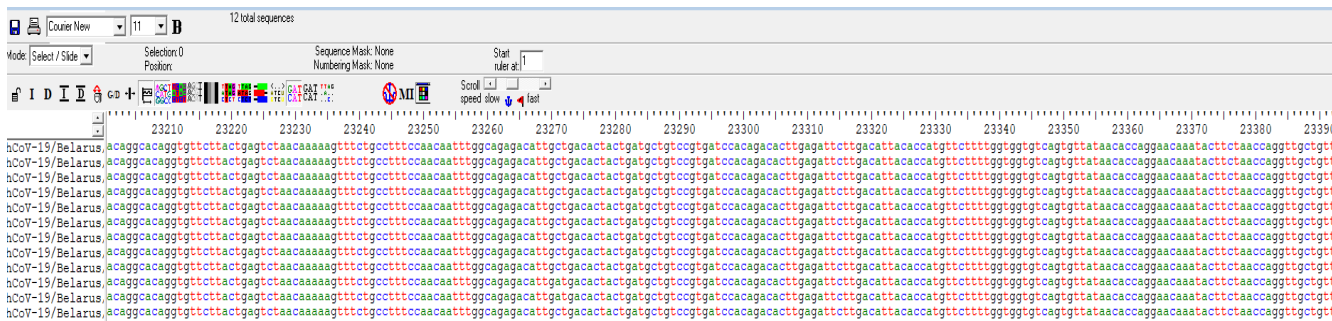
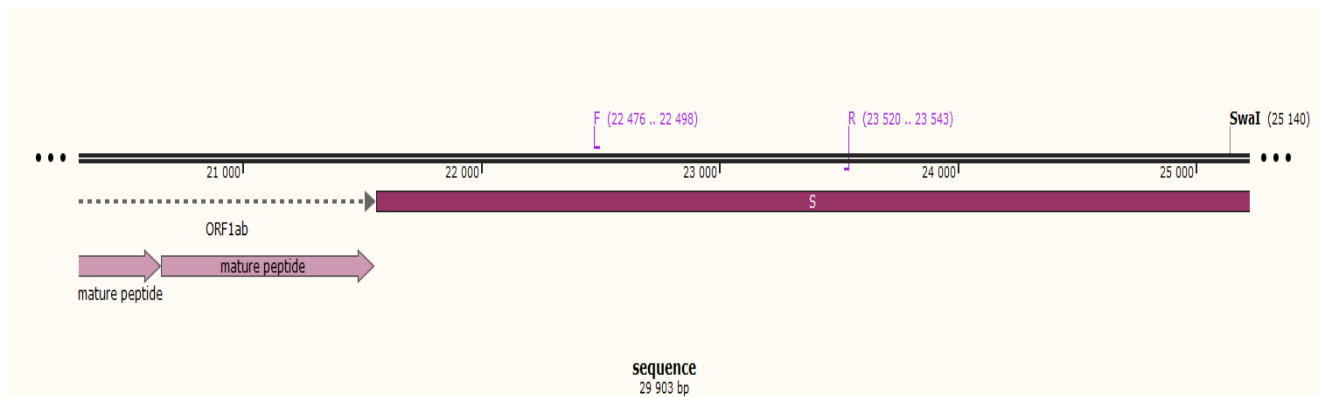
- **Целью** подобного исследования является апробация метода лабораторной диагностики выявления мутации N501Y вируса SARS-CoV-2 с помощью метода ПЦР в режиме «реального» времени с анализом кривых плавления в сравнении с классическим методом секвенирования по Сэнгеру.



МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

- В качестве исследуемого материала на наличие мутации N501Y вируса SARS-CoV-2, использовали назофорингиальные мазки.
- Экстракция РНК SARS-CoV-2 проводилась с использованием комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала методом сорбции на магнитных частицах «АртРНК Магнит»
- Реакция RT-qPCR проводилась с использованием комплекта реагентов «VirSniP SARS-CoV-2 Spike N501Y». Для получения данных для анализа кривых плавления высокого разрешения использовался амплификатор «CFX96». Анализ кривых плавления осуществлялся с использованием программного обеспечения CFX Manager Software.





- Для секвенирования участка генома использовались следующие праймеры:
Forward – CCTTCACTGTAGAAAAAGGAATC
Reverse – CATATGAGTTGTTGACATGTTTCAG

■ Электрофорез очищенных фрагментов после секвенирующей ПЦР проводили на генетическом анализаторе «3500 Genetic Analyzer» (Applied Biosystems, США).

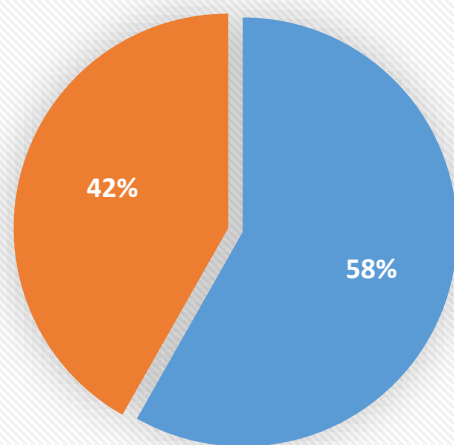
■ Анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием программных продуктов Sequencing Analysis Software v.6, BioEdit v7.0.9.0, SeqScape v.3



РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемая выборка состояла из 67 образцов, полученных от пациентов с COVID-19, находящихся с 25.03.2021 по 30.03.2021 в УЗ «Городская детская инфекционная клиническая больница»

Распределение образцов по полу



■ Мужчины (39) ■ Женщины (28)

Распределение образцов по возрасту

ЗНАЧЕНИЕ	КОЛИЧЕСТВО, ШТ.	%
меньше 18 лет	7	(10,45%±3,7)
от 18 до 25 лет	6	(8,96%±3,5)
от 26 до 35	9	(13,43%±4,2)
от 36 до 45 лет	12	(17,91%±4,7)
выше 45 лет	33	(49,25%±6,1)

Средний возраст пациентов составил 42 года



ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ДАННЫХ

- Если значение C_t на графике кривой флуоресценции больше 32 это означает, что количество вируса в исследуемой пробе менее 25 копий/мл, следовательно образец не учитывается.
- Как показали результаты амплификации 67 образцов, полученных от пациентов с COVID-19, находящихся с 25.03.2021 по 30.03.2021 в УЗ «Городская детская инфекционная клиническая больница», 23 (34,33%±5,8) образца имели значение C_t больше 32, поэтому они не учитывались в данном исследовании.

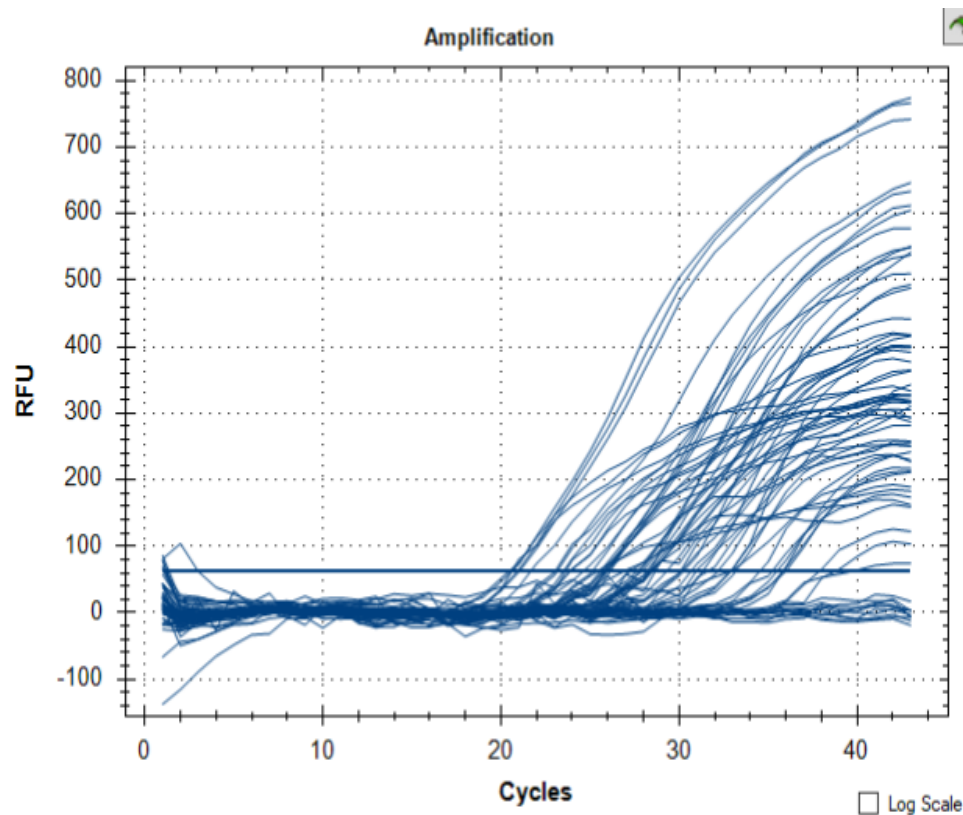


График кривой флуоресценции образцов с SARS-CoV-2



Исходя из показателей значений пиков, полученных при анализе кривых плавления было установлено, что в 26 (38,81%±5,95) образцах имелась мутация N501Y. В 18 случаях (26,87%±5,42) мутация в области N501Y выявлена не была, указывает на выявление других генетических вариантов, в геноме которых отсутствует аминокислотная замена в 501 позиции аспарагина на тирозин в S участке генома вируса.

Образцы со значением Ct меньше 32 интерпретируется по значению температуры на котором вышел пик при стадии плавления. Значение температуры на пике:
~ 60,3°C – не является вариантом Альфа (В.1.1.7),
~ 66,3°C – может быть вариантом В.1.1.7 или В.1.351.

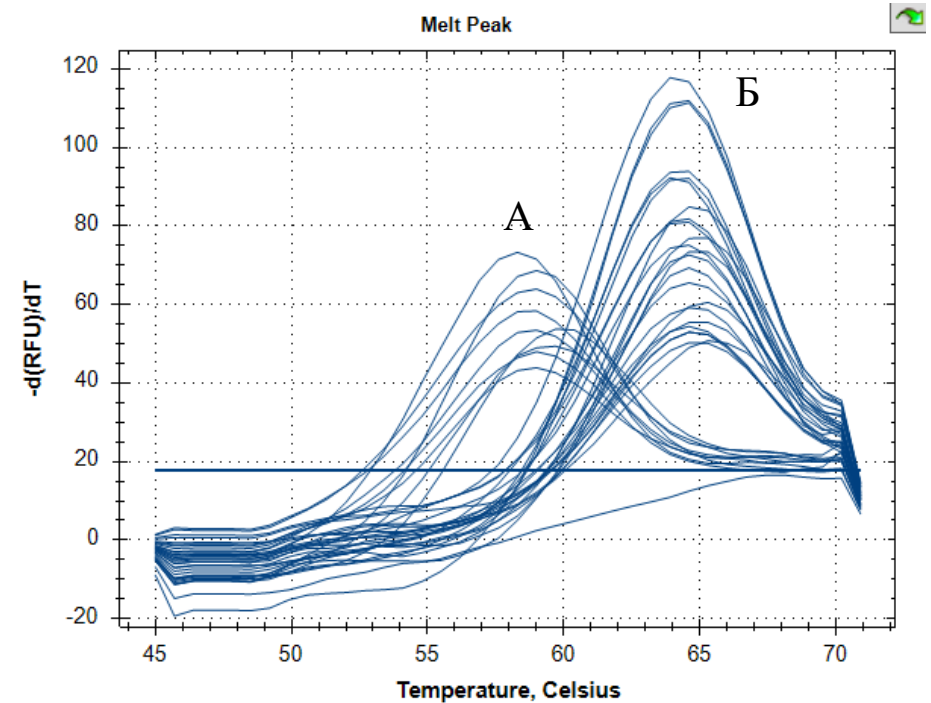


График кривых плавления для интерпретации мутации N501Y вируса SARS-CoV-2

А – белок спайк 501N – не является вариантом В.1.1.7;
Б – белок спайк 501Y – вариант В.1.1.7 или В.1.351



Параллельно было проведено частичное секвенирование 44 образцов по Сэнгеру.

Полученные сиквенсы в формате fasta были загружены на

электронный ресурс

[https://www.gisaid.org/epiflu-](https://www.gisaid.org/epiflu-applications/covsurver-mutations-app/)

[applications/covsurver-mutations-](https://www.gisaid.org/epiflu-applications/covsurver-mutations-app/)

[app/](https://www.gisaid.org/epiflu-applications/covsurver-mutations-app/), который показывает мутации

вируса SARS-CoV-2.

Как показали результаты анализа,

26 последовательностей имели

замену N501Y, что полностью

соответствует результатам,

полученным при поставке ПЦР в

режиме «реального» времени.

CoVsurver: Mutation Analysis of hCoV-19

Spin ON Spin OFF Save IMAGE

Spike glycoprotein (PDB: 6acc, EM 3.6 Angstrom) with RBD in down conformation.

Spin ON Spin OFF Save IMAGE

Spike glycoprotein (PDB: 6acj, EM 4.2 Angstrom) in complex with host cell receptor ACE2 (green ribbon).

% AA identity: 99.214%

aa changes: 10

List of variations displayed in structure (nearest residue if in loop/termini region)

H69del V70del(69) Y144del(143) N501Y A570D D614G P681H(674) T716I S982A D1118H

Query	Clade	Best reference hit	%id	%coverage	#Δs	List of aa changes
		NSP1 hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019	100%	100%	0	no aa changes
		NSP2 hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019	100%	100%	0	no aa changes
		NSP3 hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019	99.8%	100%	4	T183I, A890D, G1217R, I1412I
		NSP4 hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019	100%	100%	0	no aa changes
		NSP5 hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019	100%	100%	0	no aa changes
		NSP6 hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019	99.7%	99.0%	4	L37F, S106del, G107del, F108del
		NSP7 hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019	100%	100%	0	no aa changes
		NSP8 hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019	100%	100%	0	no aa changes
		NSP9 hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019	100%	100%	0	no aa changes
		NSP10 hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019	100%	100%	0	no aa changes
		NSP11 hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019	100%	100%	0	no aa changes
		NSP12 hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019	99.9%	99.0%	1	P323I ^{#o}
yourseq	G	NSP13 hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019	100%	100%	0	no aa changes
		NSP14 hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019	100%	100%	0	no aa changes
		NSP15 hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019	100%	100%	0	no aa changes
		NSP16 hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019	100%	100%	0	no aa changes
		Spike hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019	99.4%	99.8%	10	H69del ^{#s} , V70del ^{#s} , Y144del ^{#s} , N501Y ^{#rao} , A570D ^{#o} , D614G ^{#elo} , P681H ^{#s} , T716I, S982A ^{#o} , D1118H ^{#o}
		NS3 hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019	100%	65.8%	0	no aa changes



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- Метод RT-qPCR с анализом кривых плавления в сравнении с классическим секвенированием S участка генома, в котором расположена аминокислотная замена в 501 позиции аспарагина на тирозин, показал сопоставимость полученных результатов.
- Преимущества метода анализа кривой плавления является быстрым, доступным и легким во внедрении в лабораторную диагностику. Учитывая динамичное изменение циркулирующих генетических вариантов нового коронавируса, имеющих пандемическое распространение, дополнительные методы диагностики на основе RT-qPCR с анализом кривых плавлений позволят получить реальную и актуальную информацию о распространении отдельных генетических вариантов, имеющих уникальные мутации в отдельных участках генома вируса.
- **Однако** RT-qPCR с анализом кривых плавлений не может заменить результаты анализа нуклеотидных последовательностей, полученных методом полногеномного или частичного секвенирования 1, 2 или 3 поколения. Метод RT-qPCR с анализом кривых плавления следует использовать в качестве дополнительного инструмента для возможности существенно повысить степень отслеживания циркулирующих вариантов SARS-CoV-2.



Спасибо за внимание!

